云南植物研究 2006, 28 (6): 581～586
Acta Botanica Yunnanica

乌蕨孢子壁的形成和发育*

戴锡玲, 曹建国, 王全喜**
(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 利用光镜、扫描电镜和透射电镜对鳞始蕨科 (Lindsaeaceae) 乌蕨 (*Stenoloma chusanum* Ching) 孢壁的形成和发育进行了研究。结果表明乌蕨孢子两侧对称、单裂缝, 表面具疣状纹饰。孢壁由内壁、外壁和周壁三部分构成。外壁在四分体阶段已基本形成, 其表面光滑, 质地均匀, 由孢粉素形成。周壁是由绒毡层残余物在外壁表面沉积形成, 可分为周壁内层、周壁中层和周壁外层三部分。在周壁中层与外层之间有一层均匀的空间。最后, 本文探讨了孢壁的形成和发育规律, 研究结果对揭示孢子纹饰和孢壁各层的形成过程、来源和稳定性有重要的意义, 并为孢粉学和系统学研究提供基础资料。

关键词: 乌蕨; 孢子发育; 孢壁
中图分类号: Q 944.5　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0253-2700(2006)06-581-06

The Formation and Development of Sporoderm of *Stenoloma chusanum* (Lindsaeaceae)

DAI Xi-Ling, CAO Jian-Guo, WANG Quan-Xi**
(*Life and Environment Science College, Shanghai Normal University*, Shanghai 200234, China)

Abstract: The formation and development of sporoderm of the fern *Stenoloma chusanum* Ching (Lindsaeaceae) are studied by means of light microcope (LM), scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM). The results as follow: the mature spores of *Stenoloma chusanum* Ching are bilateral and monolete. The surface of spore is smooth and shows a verrucate ornamentation. The sporoderm consists of endospore, exospore and perispore. The exospore which is formed by sporopollenin finishes its formation in the tetrad stage. Its surface is smooth and its texture is uniform. The perispore is formed by the tapetal residues which deposit on the outside of the exospore. The perispore can be distinguished into three layers, i.e. an outer perispore layer, a middle perispore layer and an inner perispore layer. It is obvious that a layer of space exists between the middle and the outer perispore layers. In the last, the formation and development of the spore wall are discussed. The results will contribute to a better understanding of the origin, development and formation process of the sporoderm of ferns. It also can provide basic information for the palynology and phylogeny.

Key words: *Stenoloma chusanum*; Spore development; Sporoderm

孢子形态对研究蕨类植物分类和系统发育具有重要意义 (吴兆洪和秦仁昌, 1991; 王全喜等, 2001b)。有关蕨类植物孢子形态的研究已有大量的报道, 张玉龙等 (1976) 在其著作中, 系统描述了我国蕨类植物 52 科 174 属约 1000 种光镜下的孢子形态。王全喜 (2001) 主要对产自中国真蕨目各科植物孢子形态进行了扫描电镜的系统研究。形态学观察只能看到孢子周壁的表面情况, 对孢子壁的形成和发育以及各个壁层的来源尚不能解释。迄今为止, 国内尚未见对蕨类孢子

---

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 30270088)
** 通讯作者: Author for correspondence. E-mail: wangqx@shnu.edu.cn
收稿日期: 2006-01-06, 2006-03-20 接受发表
作者简介: 戴锡玲 (1973-) 女, 讲师, 在读博士生, 主要从事植物学教学与科研。

壁的形成和发育进行研究的报道，国外对蕨类植物孢壁发育的研究也相对较少，已有的工作包括：Lugardon（1966，1969，1979）研究了 *Blechnum spicant*、*Equisetum maximum*、*Osmunda regalis* 和 *Psilotum triquetrum* 的孢壁个体发生；Uffelen（1992，1993，1997）对水龙骨科蕨类孢壁的发育进行了研究；Uehara 等（1989 a, b，1999）研究了 *Equisetum arvense*、*Ophioglossum thermale* 和 *Thelypteris decursive-pinnata* 的孢壁的发育过程；Parkinson（1995）对 *Schizaea pectinata* 周壁的形成进行了研究。而对孢子壁形成和发育的研究有助于解释在成熟孢子中遇到的各种问题，有助于更好的理解不同种之间、不同等级的分类类群之间的演化关系（Uffelen，1993）。

乌蕨（*Stenoloma chusanum* Ching）属真蕨目（Filicales）鳞始蕨科（Lindsaeaceae）。王全喜（2001）主要对乌蕨孢子形态进行了扫描电镜研究，但对乌蕨孢壁的形成及发育未进行研究。本文利用光镜、扫描电镜和透射电镜相结合的方法，对乌蕨孢壁的形成和发育进行了研究，这有助于进一步了解真蕨类植物孢子外壁和周壁的来源和形成方式，为蕨类植物的系统学和孢粉学研究提供基础资料。

1 材料方法

1.1 材料的采集和固定

材料采自上海师范大学植物园，选择生长良好的植株，取不同发育时期的材料做现场固定，方法如下：把长有不同发育时期孢子囊的小叶片迅速剪下，分别放入不同的瓶中，用3%的戊二醛溶液固定，保存于0～4℃冰箱中备用。

1.2 处理和观察

1．光镜观察：将不同时期的孢子囊从孢子叶上剥离下来，用蒸馏水反复冲洗。制水封片之前将孢子囊刺破，使孢子散发在载玻片上，去除孢子囊后盖上盖玻片。用 Nikon HFX-DX 型光学显微镜观察照相。2．扫描电镜观察：把经光镜检查后的不同时期的孢子囊从叶片上剥离下来，放入 0.1mol/L 磷酸缓冲液的小瓶中，用相同缓冲液冲洗 3 次。乙醇逐级脱水，用乙酸异戊酯过渡，CO_2 临界点干燥，将干燥后的孢子囊放在铜台的双面胶上，然后将孢子囊刺破，用 EIKO IB-3 型离子溅射仪喷金。最后将材料置于 H-520 型扫描电子显微镜下观察照相。3．透射电镜观察：用 1% 锇酸水溶液在室温黑暗条件下进行后固定过夜，用 0.1mol/L 磷酸缓冲液冲洗，经丙酮逐级脱水后，将材料置于不同比例的丙酮与 Epon 812 树脂渗透液中逐级渗透，最后置于纯包埋剂中包埋，并于 60℃烘箱中聚合。在 Ultracut E 型切片机上切片，切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色。最后用 H-600 型透射电子显微镜观察照相。

2 结果

2.1 幼孢子囊的形成和结构

乌蕨孢子囊起源于单细胞，该细胞分裂形成两个细胞的孢子囊原基（图版Ⅰ：1）。孢子囊原基分化形成幼孢子囊（图版Ⅰ：2），它的外层为一层囊壁细胞，其内为绒毡层和孢子母细胞。绒毡层由两层细胞组成，细胞为长方形或扁圆形，细胞核较小，细胞质内液泡大而明显，具有丰富的造粉质体，其内可见到淀粉粒（图版Ⅰ：3）；孢子母细胞为多边形，细胞核较大，细胞质浓密，液泡小而不明显（图版Ⅰ：4）。

2.2 孢壁的形成和发育

2.2.1 孢子外壁的形成 乌蕨孢子在四分孢子阶段，外壁已经基本形成，在光学显微镜下观察，孢壁光滑、无色素沉积（图版Ⅰ：5）。在扫描电镜下观察，可见到孢子表面光滑或具微小疣状突起（图版I：6，7），在孢子的近极面有一条隆起的裂缝，几乎纵贯孢子全长（图版I：6）。在透射电镜下，可以辨别出外壁可区分为内外两层，内层较薄，染色较深，在四分体阶段，外壁内层是由孢粉素构成的球状体沉积而成（图版I：8，箭头），在球状体的下方，还可见到一条清晰的白线（图版I：8，9，箭），随着外壁的发育，球状体层和白线消失（图版I：10）。外壁染色较浅，厚度不均，在远极面较薄，宽约 1 μm，在近极面较厚，裂缝基部厚度可达到 1.5 μm 左右，外壁表面较光滑或具微小疣状突起。孢子裂缝呈顶端狭，基部宽的三角形，外壁完全形成后，裂缝的高度可达 4.5～5 μm（图版Ⅰ：8，9）。

2.2.2 孢子周壁的形成 孢子外壁形成后，可见到孢子的外方有大量的绒毡层残余物（图版Ⅰ：10），这些绒毡层残余物在成熟外壁表面迅速沉积形成了孢子周壁内层（图版Ⅰ：11）。周壁内层形成初期，绒毡层物质在外壁表面疏松分布，内部有许多空隙（图版Ⅰ：11）。在光镜下，周壁内层为一些片层状物，这些片状物有色素沉

积，呈桔黄色（图版Ⅰ：12）。在扫描电镜下，这些片层上具有许多蜂窝状结构（图版Ⅰ：13），这些片状物在孢子的近极面分布的较多，远极面分布较少，但周壁内层并没有覆盖孢子裂缝。在透射电镜下，周壁内层只覆盖到裂缝的中部（图版Ⅱ：26）。随着周壁内层的发育，这些疏松结构的片状物逐渐变成较紧实的一层，但表面仍有小的蜂窝状结构和小孔分布，与外壁结合不紧密，易开裂脱离（图版Ⅰ：14，15）。

周壁内层形成后，绒毡层物质继续在周壁内层的表面沉积形成周壁中层。在光镜下，周壁中层表面由疣状突起构成（图版Ⅱ：16）。在扫描电镜下，疣状突起非常明显（图版Ⅱ：17～20），在孢子裂缝上也出现了相同的疣状突起（图版Ⅱ：20），在疣状突起表面和突起之间还有丝状物连接（图版Ⅱ：19，箭）。随着周壁中层的进一步发育，突起的表面分布有大量细小的颗粒，直径约 0.15 μm（图版Ⅱ：17，21），这些颗粒在孢子表面沉积，逐渐填入突起之间的缝隙，使得孢子表面越来越平滑（图版Ⅱ：17）。

周壁中层形成后，在孢子表面还会形成一层较薄的周壁外层。周壁外层表面较光滑，亦呈现疣状突起的形态，也就是孢子的表面纹饰（图版Ⅱ：22～25）。在扫描电镜下，可清晰见到周壁外层与周壁中层之间具有一层较大的空间。在透射电镜下，成熟孢子各层十分清晰（图版Ⅱ：26～28），周壁内层厚约 0.8～1.0 μm。周壁中层厚约 0.4～0.6 μm，表面疣状纹饰的轮廓，疣的高低、直径不等。周壁外层较薄，由一些薄的层片构成，厚约 0.2～0.3 μm，周壁外层与周壁中层之间的宽约 0.4～1.0 μm。周壁外层与中层之间结合不十分紧密，有时会发生脱落。周壁与外壁之间的结合得不很紧密，有时也会发生开裂分离的现象（图版Ⅱ：27）。

3　讨论

真蕨目蕨类孢子壁通常可分为 3 层，即孢子周壁、孢子外壁和孢子内壁，但内壁在静止的孢子中通常是不存在的，只有在孢子萌发时才会显现（Tryon and Lugardon，1991）。因此，本文只对乌蕨孢子的外壁和周壁进行了研究。王全喜（2001a）对乌蕨孢子的形态进行了扫描电镜的观察，表明乌蕨孢子外壁光滑，周壁明显，表面平滑或呈疣状纹饰。但未对孢壁各层的来源及其稳定性等进行研究。

本文的研究表明乌蕨孢子外壁是由两层构成的，外壁内层较薄，由球形的孢粉素沉积形成。外壁外层较厚，是由不定型的孢粉素构成。Uffelen（1993）指出水龙骨科植物（*Drynaria*）孢子外壁内层是沉积在质膜表面的一层暗的孢粉素层；外壁外层的形成过程较为复杂，但仍然是由不同形式的孢粉素构成。Tryon and Lugardon（1991）指出构成外壁的物质是孢粉素，很难被乙酰水解，因此，外壁对孢子具有很好的保护作用。在研究苔藓孢子外壁内层形成时，Brown and Lemmon（1988）观察到了一条白线，他们认为这条白线可能表明外壁内层是由孢子原生质分泌的物质和孢子之外的物质共同形成的。我们在四分体时期也观察到白线的存在（图版Ⅰ：8，9 箭），但有关其来源尚需进行深入的研究。

蕨类植物的孢子周壁分为 3 种类型，即实心型（solid type）、空心型（cavity type）和棒状型（rodlet type）（Tryon and Lugardon，1991）。乌蕨孢子周壁可分为 3 层，周壁外层与周壁中层之间有较大的空间（图版Ⅱ：26，28），因此，乌蕨孢子周壁应属于空心型。王全喜（2001a）对乌蕨成熟孢子形态的扫描电镜的观察表明乌蕨孢子外壁光滑，周壁明显，二者易于区分。这表明乌蕨成熟孢子周壁的稳定性较差，容易剥落。Tryon and Lugardon（1991）指出周壁的理化性质以及超微结构均与外壁有明显差别，因此周壁容易与外壁之间发生分离。这一点在本研究得到证实，不但周壁的外层容易发生剥落，周壁与外壁之间也容易发生分离，导致成熟孢子暴露出孢子外壁的现象。关于周壁的来源，Uffelen（1993）指出 *Drynaria* 孢子周壁是由绒毡层残余物在外壁表面快速沉积形成。Tryon and Lugardon（1991）指出周壁是由衰老的原生质绒毡层（plasmodial tapetum）所分泌的丝状 - 颗粒状物质形成。本研究表明外壁完全形成之后，孢子外面有大量的绒毡层的残余物，这些残余物能快速沉积到孢子外壁的表面（图版Ⅰ：10，11），作者支持他们的观点。周壁的性质与外壁区分明显，除了与保护作用有关外，还可能与孢子的传播等有关。

〔参考文献〕

王全喜, 2001a. 中国水龙骨目(真蕨目)孢子形态的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学(博士学位论文)

吴兆洪, 秦仁昌, 1991. 中国蕨类科属志[M]. 北京: 科学出版社

张玉龙, 席以珍, 张金谈等, 1976. 中国蕨类植物孢子形态[M]. 北京: 科学出版社

Brown RC, Lemmon BE, 1988. Sporogenesis in Bryophytes [J]. *Adv Bryol*, **3**: 159—223

Lugardon B, 1966. Formation de l'exospore chez *Blechnum spicant* (L.) Roth [J]. *C R Acad Sci Paris ser D*, **262**: 2029—2031

Lugardon B, 1969. Sur la structure fine des parois sporales d'*Equisetum maximum* Lamk [J]. *Pollen Spores*, **11**: 449—474

Lugardon B, 1979. Sur la formation du sporoderme chez *Psilotum triquetrum* Sw. (Psilotaceae) [J]. *Grana*, **18**: 145—165

Parkinson BM, 1995. Spore wall development in *Schizaea pectinata* (Schizaeaceae: pteridophyta) [J]. *Grana*, **34**: 217—228

Tryon AF, Lugardon B, 1991. Spores of the Pteridophyta [M]. Spriger-Verlag New York Inc

Uehara K, Kurita S, 1989a. An ultractructural study of spore wall morphogenesis in *Equisetum arvense* [J]. *Amer J Bot*, **76**: 939—951

Uehara K, Kurita S, 1989b. Ultrastructual study of spore wall morphogenesis in *Ophioglossum thermale* Kom, var. *nipponicum* (Miyabe et kudo) Nishida [J]. *Bot Mag Tokyo*, **102**: 413—427

Uehara K, Nishino E, 1999. Ultrastructural study of spore wall development in *Thelypteris decursive-pinnata* (Thelypteridaeae) [J]. *Tech Bull Fac Hort Chiba Univ*, 19—28

Uffelen GA, 1992. Sporogenesis in Polypodiaceae (Filicales). Ⅱ. The genera Microgramma Presl and Belvisia Mirbel [J]. *Blumea*, **36**: 515—540

Uffelen GA, 1993. Morphogenesis and evolution of the spore wall of Polypodiaceae (Filicales) [M]. Leiden: Rijksherbarium Hortus Botanicus

Uffelen GA, 1997. The spore wall in Polypodiaceae: development and evolution [A]. In: RJ Johns (Ed.), Holttum Memorial volume [M]. Royal Botanic Gardens, 95—117

Wang QX (王全喜), Yu J (于晶), Zhang XC (张宪春), *et al*, 2001b. Spore morphology of pteridophytes from China Ⅰ. Lygodiaceae [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), **39** (1): 38—44

图版说明

图版Ⅰ: 1. 孢子囊原基(TEM); 2, 3. 幼孢子囊(TEM), 示绒毡层细胞; 4. 幼孢子囊(TEM 观察), 示多边形的孢子母细胞; 5～7. 孢子外壁形成时期: 5. LM 观察; 6. 近极面及裂缝; 7. 远极面; 8. 四分体时期孢子外壁已基本形成(TEM 观察)(箭头示球形的孢粉素, 箭示白线); 9. 孢子裂缝的横切(箭示白线); 10. 外壁形成时期, 孢子外方有大量的绒毡层残余物; 11. 绒毡层残余物沉积到外壁的表面; 12～13. 周壁内层形成早期(LM 和 SEM 观察); 14, 15. 周壁内层形成的后期(LM 和 SEM 观察)。T, 绒毡层细胞; SMC, 孢子母细胞; E, 孢子外壁; TR, 绒毡层残余物; Pi, 周壁内层。标尺: 2 μm (8～11); 5 μm (1～4, 13, 15); 10 μm (5～7, 12, 14)。

图版Ⅱ: 16～21. 孢子周壁中层观察: 16. LM 观察; 17. SEM 观察; 18. 中层形成时仍可见到孢子周围的绒毡层残余物; 19. 疣状突起表面放大(箭示丝状物); 20. 中层形成时近极面的情况; 21. 中层形成后期, 孢子表面有许多细小的颗粒; 22. 成熟孢子(SEM 观察), 示孢子周壁外层表面的光滑; 23, 24. 成熟孢子照片(LM 和 SEM 观察); 25. 成熟孢子周壁外层破裂露出壁中层; 26. 成熟孢子近极面横切(TEM 观察); 27, 28. 成熟孢子 TEM 观察。TR, 绒毡层残余物; E, 孢子外壁; Pi, 周壁内层; Pm, 周壁中层; Po, 周壁外层。标尺: 2 μm (21, 26, 27, 28); 3 μm (19, 20); 5 μm (17, 18, 22, 24, 25); 10 μm (16, 23)。

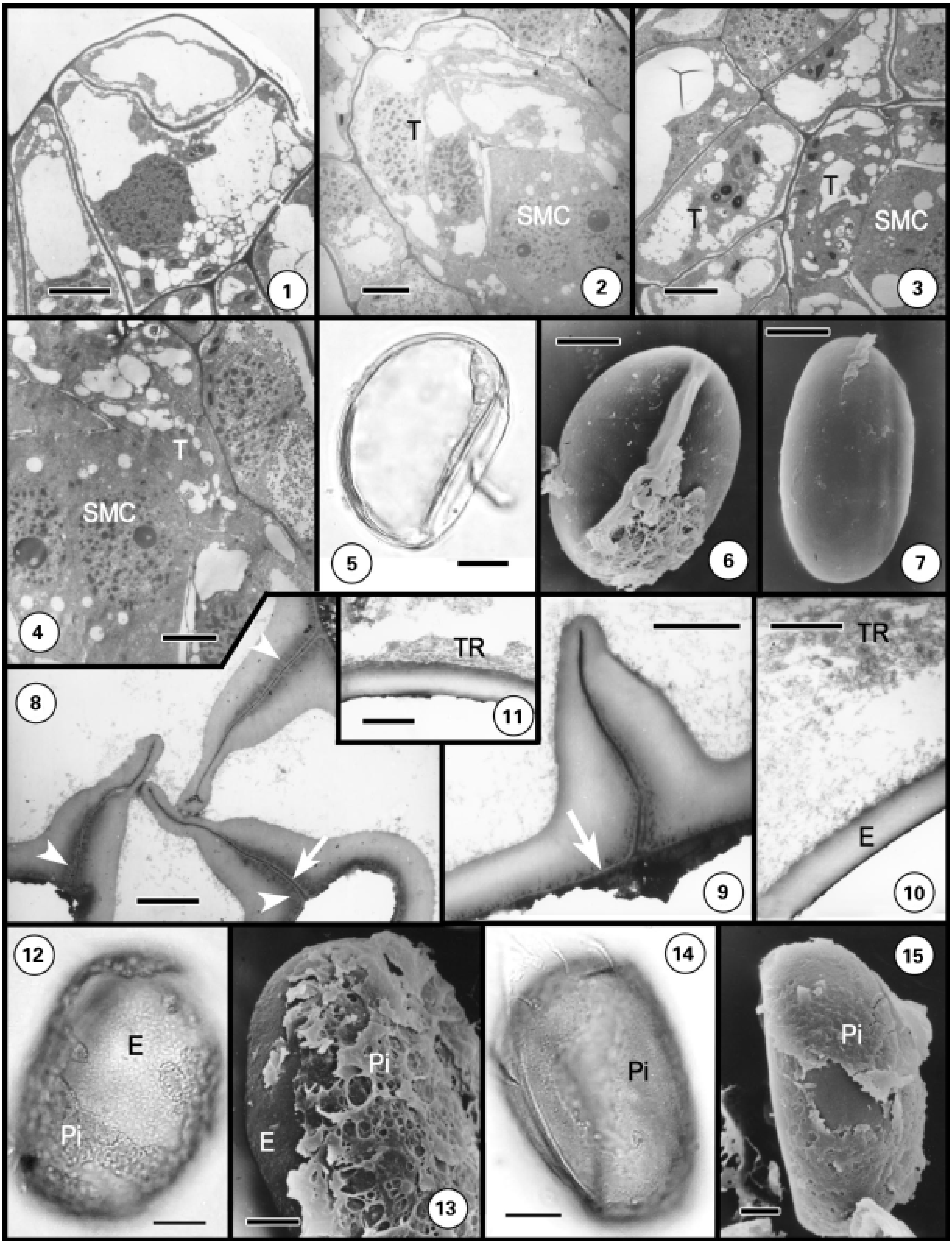
Explanation of Plates

Plate Ⅰ. 1. The initial cell of sporangium (TEM observation); 2, 3. The young sporangium observed under TEM, showing the tapetum cells; 4. The young sporangium observed under TEM, showing the polygonal spore mother cells; 5-7. Spore in the stage only with exospore layer: 5. LM observation; 6. Showing the proximal face and aperture; 7. Showing the distal face; 8. In the tetraspore stage, the exospore has been formed almost completely (TEM observation), some rounded sporopolleninous bodies (arrowheads) and a white line are visible in the inner layer of exospore; 9. The cross section of aperture, the white line also exist (arrow); 10. There are many tapetal residues (TR) outside the exospore in the stage of exospore formation; 11. The tapetal residues have been deposited on the surface of exospore; 12, 13. The early stage of the inner perispore layer formation, LM and SEM observation; 14, 15. The late stage of the inner perispore layer formation, LM and SEM observation. T, tapetum cells; SMC, spore mother cells; TR, tapetal residues; E, exospore; Pi, inner perispore. ars: 2 μm (8-11); 5 μm (1-4, 13, 15); 10 μm (5-7, 12, 14).

Plate Ⅱ. 16-21. The formation of the middle perispore layer: 16. LM observation; 17. SEM observation; 18. The tapetal residues are also visible in the stage of the middle layer formation; 19. Magnification of surface of the middle layer showing the verrucate projections, sometimes the filaments are visible connecting the projections; 20. The proximal face and aperture in this stage; 21. In the late stage of the formation of the middle layer, many small grains are visible on the surface of the spore; 22. The mature spore showing the surface of spore; 23, 24. The mature spore under LM and SEM; 25. The mature spore, some parts of the spore wall has been broken. The middle and outer layers are visible. 26. Proximal section of mature spore; 27-28. TEM observation of mature spores. TR, tapetal residues; E, exospore; Pi, inner perispore. Bars: 2 μm (21, 26, 27, 28); 3 μm (19, 20); 5 μm (17, 18, 22, 24, 25); 10 μm (16, 23).

戴锡玲等：图版 I

DAI Xi-Ling *et al*: Plate I



戴锡玲等：图版II DAI Xi-Ling *et al*: Plate II